

**KEANEKARAGAMAN GENETIK DAN IDENTIFIKASI JENIS  
KELAMIN *Lonchura fuscans* SECARA MOLEKULER**

***GENETIC DIVERSITY AND SEX IDENTIFICATION OF *Lonchura fuscans*  
USING MOLECULAR METHOD***

Carolina Yulent Carlen<sup>1</sup>, Ignatius Pramana Yuda<sup>2</sup>, Felicia Zahida<sup>3</sup>  
Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta,  
carlyulentcarl@yahoo.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keualitas primer BF02 dan BF03 dalam mengamplifikasi sampel spesies *Lonchura fuscans* mengetahui kualitas primer 2550F/2718R dalam mengidentifikasi jenis kelamin pada spesies *Lonchura fuscans*, dan mengetahui keragaman genetik. Sejumlah 13 sampel darah kering burung bondol kalimantan (*Lonchura fuscans*) dikoleksi sebagai sumber DNA. Sampel DNA diekstraksi dengan PCE (*phenol chloroform extraction*). Locus mikrosatelit yang digunakan adalah BF02 dan BF03, diamplifikasi dengan teknik *touchdown* PCR (*polymerase chain reaction*). Hasil dari penelitian ini adalah terdapat 4 alel pada locus BF02 pada sampel burung bondol kalimantan (*Lonchura fuscans*). Primer BF02 dapat mengamplifikasi spesies *Lonchura fuscans* dengan frekuensi masing-masing alel 0,3077; 0,5; 0,0769, dan 0,0384. Heterozigositas locus BF02 sebesar 0,154. Primer BF03 harus dilakukan optimasi untuk mengamplifikasi sampel *Lonchura fuscans*. Dilakukan sexing dengan primer 2550F/2718R ditemukan 11 jantan dan 2 betina.

Kata kunci : keragaman genetik, mikrosatelit, *Lonchura fuscans*, primer BF02 dan BF03, *sexing*, primer 2550F/2718R

## PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara dengan keanekaragaman hayati sangat tinggi (*megabiodiversity*). Keanekaragaman hayati adalah ketersediaan keanekaragaman sumber daya hayati berupa jenis maupun kekayaan plasma nutfah (keanekaragaman genetik di dalam jenis), keanekaragaman antar jenis dan keanekaragaman ekosistem (Sudarsono dkk., 2005).

Keanekaragaman gen adalah segala perbedaan yang ditemui pada makhluk hidup dalam satu spesies (Indrawan dkk., 2007). Pengetahuan tentang keragaman genetik sangat penting karena akan memberikan suatu informasi dasar dalam pengembangan tanaman selanjutnya. Dalam keanekaragaman yang tinggi menyimpan gen berpotensi yang tinggi pula. Perkembangan ilmu pengetahuan mempermudah mendeteksi keragaman genetik suatu individu berbasis molekuler. Secara umum keanekaragaman genetik dari suatu populasi dapat terjadi karena adanya mutasi, rekombinasi, atau migrasi gen dari satu tempat ke tempat lain.

Keanekaragaman genetik juga dipengaruhi oleh perkawinan antara jantan dan betina. Adanya perkawinan sedarah akan mempengaruhi frekuensi alel dan menambah variasi genetik dalam suatu populasi. Jumlah jantan dan betina di alam yang seimbang sebagai faktor adanya variasi genetik. *Molecular sexing* berdasarkan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan metode yang tepat, cepat dan efektif untuk melakukan *sexing* (Reddy dkk, 2007).

Bondol Kalimantan (*Lonchura fuscans*) termasuk dalam famili *Estrildidae* dan genus *Lonchura*, dan biasa dikenal dengan sebutan pipit hitam. Spesies ini berada pada status LC (beresiko rendah) menurut daftar merah IUCN. Mikrosatelit banyak digunakan pemulia sebagai marka pembantu seleksi karena keberadaanya melimpah, bersifat kodominan dan sangat polimorfik (Bennett, 2000).

Masih sangat sulit mendapatkan penelitian mengenai bondol kalimantan, sehingga perlu adanya penelitian lebih mengenai ragam genetik yang dimiliki bondol kalimantan. Melalui analisis keragaman genetik dan penentuan jenis kelamin bondol kalimantan dapat memberi informasi lebih lanjut terkait keragaman genetik DNA dari burung bondol kalimantan.

## METODE

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain jarum suntik, *tube*, *adjustable pipet*, *tip*, *waterbath*, *centrifuge*, *thermal cycler*, *pcr tube*, *microwave*, *vortex*, *gel doc*, pinset, freezer, oven, mikrosetrifuge, tabung ukur, erlenmeyer, elektrofotor, timbangan, dan cetakan gel agarosa.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain sampel darah burung bondol kalimantan dari Tempurukan sebanyak 13 ekor, kertas saring, PBS (*phosfat buffer salin*), proteinase-K, larutan *buffer* ekstraksi, larutan PCI, larutan CI, ethanol *absolute* 95%, larutan NaCl, larutan ethanol 70%, serbuk gel agarosa (Roche), pewarna gel agarosa (*Sybr safe*, *Invitrogen*), *loading dye*, primer, *master mix* PCR, aquabides, *Te buffer*, *TBE buffer*, *DNA ladder*, kapas, alkohol 70%, alkohol 96%, plastik c-tik, label dan parafilm.

Sampel burung diambil dari Desa Tempurukan, Kecamatan Muara Pawan, Kabupaten Ketapang. Analisis molekuler ini dilaksanakan pada bulan Maret-September 2015 di Laboratorium Bio Molekuler, Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta dan Laboratorium Mikrobiologi PAU UGM Yogyakarta.

Ekstraksi DNA sampel darah burung bondol kalimantan menggunakan metode PCE (*phenol chloroform extraction*). Protokol atau langkah kerja ekstraksi DNA dengan metode PCE ini mengikuti protokol Bello dkk (2011) dengan modifikasi.

Kertas saring yang berisi materi DNA berupa resapan darah dari bondol kalimantan dipotong 2-3mm, dimasukkan dalam mikrotube 1,5 ml. Proteinase K sebanyak 20 µl dan 700 µl *Lysis buffer* (50 mM Tris-HCl pH 8; 20 mM *ethylenediaminetetraacetic* (EDTA), 2% *sodiumdodecylsulfate* (SDS)) ditambahkan ke dalam tube berisi sampel dan divortex selanjutnya *dispindown*. Sampel selanjutnya diinkubasi dengan *waterbath shaker* 37°C selama 24 jam.

Setelah mengalami proses *lysis*, sample disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 10 menit dan supernatan hasil sentrifugasi dipindahkan ke dalam microtube yang baru untuk tahap purifikasi DNA. Purifikasi DNA menggunakan protokol *phenol chloroform isoamylalkohol* (PCI).

Purifikasi PCI dilakukan dengan menambahkan *Phenol-Chloroform- Isoamyl* sebanyak 700 µl setelah itu divortex dan dispin down selanjutnya diletakkan dalam freezer selama 5 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan maksimal (13000 rpm) selama 2 menit. Bagian supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam *microtube* baru. Supernatan ditambahkan *Chloroform-Isoamyl* sebanyak 400 µl, kemudian divortex dan dispin down, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan maksimal (13000 rpm) selama 2 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam *microtube* baru.

Setelah supernatan dimasukkan ke dalam *microtube* baru kemudian ditambahkan ethanol absolute 95% sebanyak dua kali volume supernatan (750 µl) dan NaCl sebanyak 20 µl kemudian diinkubasi dalam suhu ruang selama 5 menit, setelah itu disentrifuse dengan kecepatan 13000 rpm selama 15 menit. Setelah sampel disentrifugasi, supernatan dibuang dan ditambahkan ethanol 70% sebanyak 500 µl, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 2 menit.

Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang dan *microtube* dikeringkan hingga tidak ada lagi ethanol yang tersisa. Setelah tidak ada ethanol yang tersisa *microtube* ditambahkan *double destilated H<sub>2</sub>O* sebanyak 50 µl, kemudian pelet DNA diresuspensi. Setelah itu hasil isolasi dilakukan uji kualitas DNA dengan melakukan proses elektroforesis dengan Agarose 0,8%, Tegangan 100 Volt dengan waktu 20 menit.

Penyusunan *master mix* dilakukan dengan mencairkan yaitu 25µl reaksi yang mengandung 10x buffer PCR, 50 mM MgCl, 2mM dNTPs, 10µl primer F, 10µl primer R, ddH<sub>2</sub>O, DNA template, dan Taq polymerase. Reaksi pencampuran dipersiapkan seperti pada Tabel 1. Pencampuran dilakukan perlahan pada PCR tube.

Tabel 1. Komponen Reaksi Master Mix Primer BF02 dan BF03

Reagen	BF02		BF03	
	Volume (µl)	Konsentrasi Akhir	Volume (µl)	Konsentrasi Akhir
ddH <sub>2</sub> O	16,3	-	15,8	-
10x PCR buffer	2,5	1x	2,5	1x
2mM dNTP	1,25	0,1mM	1,25	0,1mM
50mM MgCl	1,25	2,5mM	1,25	2,5mM
10mM Primer F	1,25	0,5mM	1,25	0,5mM

10mM Primer R	1,25	0,5mM	1,25	0,5mM
DNA Template	1	-	1	-
5u/μl <i>Taq pol</i>	0,2	1u	0,2	1u
BSA	-	-	0,5	-

Sekuen mikrosatelit primer BF02 dan BF03 yang digunakan mengacu pada penelitian Yodogawa dkk (2003) dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Sekuens Mikrosatelit Primer BF02 dan BF03

Lokus	Sekuens Primer	Motif Pengulangan	T <sub>m</sub> (°C)
BF02	F: 5'-GCCTAAAGAGTATCCCATGA-3' R: 5'-AAATCTCCCACAACCCCT-3'	(CAA) <sub>8</sub>	58
BF03	F: 5'-GGCTTAGCAGACAGCTTTGG-3' R: 5'-GGAACAAGCAGCCAGCAC-3'	(CA) <sub>10</sub> AA(CA) <sub>20</sub>	60

Metode *sexing* dengan PCR dilakukan dengan membuat campuran reagen 25 μl yang mengandung 10x buffer PCR, 50 mM MgCl, 2mM dNTPs, 10μl primer F, 10μl primer R, ddH<sub>2</sub>O, DNA template, dan Taq polymerase. Primer yang digunakan adalah 2250F/2718R yang mengacu pada penelitian Wirastika (2013). Reaksi pencampuran dapersiapkan seperti pada Tabel 3:

Tabel 3. Komponen Reaksi Master Mix Primer 2550F/2718R

Reagen	Volume (μl)	Konsentrasi Akhir
ddH <sub>2</sub> O	15,3	-
10x PCR buffer	2,5	1x
2mM dNTP	2,5	0,2mM
50mM MgCl	1	1,5mM
10mM Primer F	1	0,2mM
10mM Primer R	1	0,2mM
DNA Template	1	1 μl
5u/μl <i>Taq pol</i>	0,2	2u

Amplifikasi sampel DNA menggunakan metode touchdown PCR yang mengacu pada penelitian Yuda (2008). Tahapan dan kondisi program PCR untuk primer BF02 dan BF03 dengan metode touchdown PCR dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Tahapan dan Kondisi Program *touchdown* PCR

Tahapan		Waktu	Suhu	Siklus
Tahap aktivasi		5 menit	94°C	-
Tahap 1	Denaturasi	30 detik	94°C	4 siklus
	Penempelan	20 detik	60°C	
	Pemanjangan	30 detik	72°C	
Tahap 2	Denaturasi	30 detik	94°C	4 siklus
	Penempelan	20 detik	58°C	
	Pemanjangan	30 detik	72°C	
Tahap 3	Denaturasi	30 detik	94°C	22 siklus
	Penempelan	20 detik	55°C	
	Pemanjangan	30 detik	72°C	
Final extention		5 menit	72°C	-

Elektroforesis mikrosatelit menggunakan *ultrapure agarose gel* (Invitrogen) dengan konsentrasi 3% pada 1X TBE. Protokol dari *Agarose Gel Elektroforesis* (AGE) diadaptasi dari protokol Laboratorium DNA LIPI (Sulandari dan Zein, 2003).

Hasil elektroforesis diambil dan dimasukkan ke dalam *gel doc* (Gel Logic 2000) untuk dilihat dan didokumentasikan Panjang pita DNA yang terbentuk diukur dengan menggunakan *software Kodak Molecular Imaging*. Selanjutnya diolah dengan rumus manual untuk menghitung frekuensi masing-masing alel setiap lokus mikrosatelit berdasarkan rumus Nei (1987).

Rumus Nei (1987) :

$$X_i = \frac{(2n_{ii} + \sum n_{ij})}{2n}$$

Keterangan:

$X_i$  = frekuensi alel

$n$  = jumlah sampel

$n_{ii}$  = jumlah individu bergenotipe homozigot alel  $i$

$n_{ij}$  = jumlah individu bergenotipe heterozigote alel  $i$

$$h = \frac{2n (1 - \sum x_i^2)}{2n - 1}$$

Keterangan :

$n$  = jumlah sampel

$h$  = heterozigositas

$X_i$  = frekuensi alel ke  $i$

## HASIL dan PEMBAHASAN

Hasil dari uji kualitatif terhadap 13 sampel DNA hasil ekstraksi dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1% dalam 30 ml selama 20 menit pada 100 volt. Tahap ekstraksi sangat diperlukan dalam proses awal molekuler. Ekstraksi DNA pada organisme eukaryot (manusia, hewan, dan tumbuhan) umumnya dilakukan dengan beberapa tahapan dasar seperti degradasi dinding sel, penghilangan RNA dan protein serta presipitasi dan purifikasi DNA.

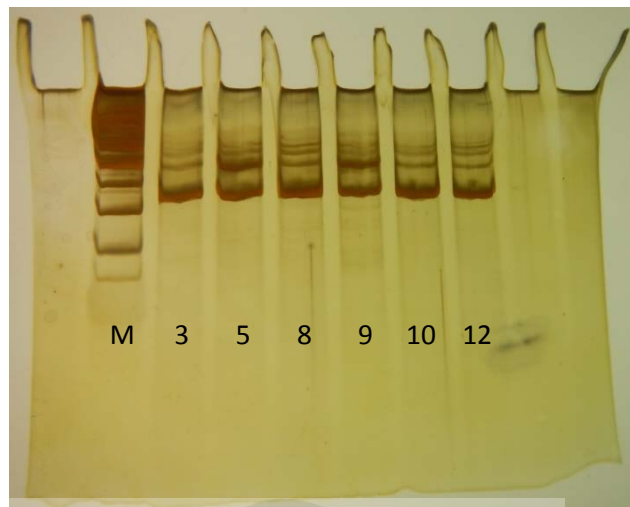
Hasil ekstraksi darah kering bondol kalimantan dengan menggunakan metode PCE (konvensional) memperlihatkan bahwa sampel memiliki kandungan DNA, namun DNA yang dihasilkan sangat tipis. Metode PCE yang digunakan untuk ekstraksi dalam penelitian ini memiliki beberapa kelemahan yaitu menghasilkan tingkat kemurnian yang rendah, masih ada kontaminasi dari protein atau fenol saat proses ekstraksi dilakukan, dan membutuhkan waktu pengerjaan yang cukup lama dan tahapan lebih rumit (Fatchiyah dkk., 2006).

Hasil amplifikasi DNA burung bondol kalimantan dengan metode *touchdown* PCR, yang dielektroforesis pada 3% (*Roche Agarose Gel*) dalam TAE 1x selama 45 menit pada 100 volt. Hasil amplifikasi dari primer menghasilkan satu pita (*single band*) DNA dengan ukuran pita diantara 300bp – 400 bp. Primer yang digunakan adalah primer BF02 dengan menggunakan metode *touchdown* PCR. Hasil *touchdown* PCR pada sampel darah kering burung bondol kalimantan dengan primer BF02 dapat teramplifikasi.

Pita tunggal yang dihasilkan karena lokus mikrosatelit mengandung dinukleotida yang berulang yang mengamplifikasi produk PCR pada kisaran 130 sampai 200 bp, dimana jika susunannya berbeda setiap 2 bp maka pada kisaran tersebut gel agarose tidak mampu digunakan. Peningkatan resolusi gel akrilamid lebih tinggi dari pada gel agarose menyebabkan gel tersebut mampu mendeteksi sejumlah besar alel per lokus (Macaulay dkk., 2001).

Ukuran yang dihasilkan menunjukkan primer BF02 dapat mengamplifikasi sampel burung bondol kalimantan. Hal ini ditunjukkan dengan kisaran ukuran pita DNA yang tidak jauh berbeda dengan acuan yang digunakan yaitu menurut Yodogama (2003), primer BF02 mengamplifikasi sampel genus *Lonchura* pada ukuran 366bp. Jumlah alel yang diamplifikasi oleh primer BF02 adalah 4 (empat) alel. Pada penelitian Yodogawa (2003) primer BF02 mengamplifikasi 4 (empat) alel dari bengalese finch dan 4 (empat) alel dari javan munia. Sedangkan pada penelitian Yuda (2008), primer BF02 mengamplifikasi sampel java sparrow berjumlah 6 (enam) alel.

Proses selanjutnya mengelektroforesis hasil amplifikasi PCR yang memiliki band jelas atau tebal, yaitu sampel 3, 5, 8, 9, 10, dan 12. Sampel tersebut dilakukan elektroforesis vertical (PAGE) dengan pewarnaan perak. Pita yang muncul pada gel poliakrilamid adalah suatu alel mikrosatelit. Keragaman alel mikrosatelit dapat dilihat dari beda jarak migrasi alel pada gel (Krawczak dan Schmidtke, 1994).



Gambar 1. Hasil elektroforesis PAGE dengan pewarnaan perak  
Keterangan: M= ladder 100bp, angka 3,5,8,9,10,12= nomor individu

Pada proses ini dapat dilihat bahwa pita DNA yang tebal dapat terpisah, namun hasil ini belum dapat membuktikan bahwa pita DNA yang terbentuk merupakan diploid. Beberapa pita tipis terbentuk pada sampel 3, 8, 10, dan 12 yang masih diragukan bahwa pita yang terbentuk merupakan diploid. Pada sampel 5 dan 9 terdapat dua pita yang terpisah dengan jelas yang mengindikasikan bahwa sampel tersebut memiliki pita diploid. Hasil PAGE dari delapan sampel memperlihatkan adanya dua alel pada sampel 5 dan sampel 9. Rentang ukuran antar alel untuk sampel 5 antara 339,2bp – 464,5bp dan sampel 9 antara 368,3bp – 472,6bp.

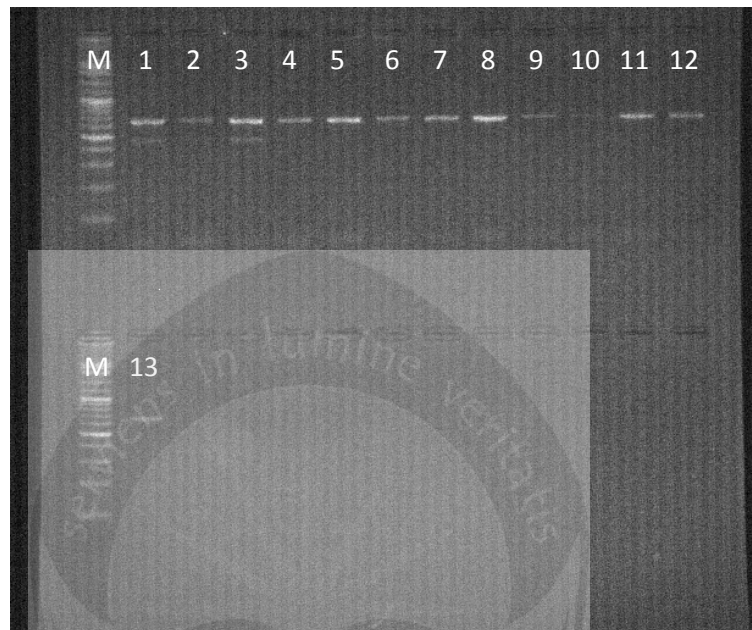
Heterozigositas merupakan salah satu parameter yang digunakan untuk mengukur tingkat keragaman genetik dalam populasi (Tanabe dkk., 1999). Frekuensi alel untuk alel I adalah 0,3077, alel II adalah 0,5, alel III adalah 0,0769, dan alel IV adalah 0,0384. Sedangkan untuk heterozigositas dari 4 (empat) alel sampel burung bondol Kalimantan adalah 0,154, hasil ini belum dapat dibandingkan dengan penelitian lain karena belum mewakili suatu populasi dan belum ada penelitian terdahulu mengenai burung bondol Kalimantan.

Pada amplifikasi primer BF03 untuk burung bondol kalimantan harus melalui optimasi PCR pdengan penambahan BSA sebanyak 0,5µl. Setelah dilakukan optimasi, primer BF03 baru dapat mengamplifikasi dua sampel burung bondol kalimantan. Namun, saat dilakukan amplifikasai pada 13 sampel burung bondol kalimantan, tidak ada pita yang terbentuk, sehingga masih harus dilakukan optimasi PCR yang lain. Pada penelitian Yodogawa (2003), primer BF03 mengamplifikasi sampel genus *Lonchura* pada ukuran 191 bp.

Gen CHD (*chromo-helicase-DNA-binding*) merupakan gen yang terdpat pada kromosom sex dan dapat digunakan untuk menentukan jenis kelamin burung secara molekular (Griffths dkk., 1998). Burung betina memiliki gen CHD-W dan CHD-Z yang akan teramplifikas menjadi dua sequence saat PCR. Sedangkan burung jantan memilikidua gen CHD-Z yang ketika teramplifikasinsaat proses PCR hanya satu sequence. Ketika gen-gen tersebut dielektroforesis maka sampel

betina akan tampak memiliki dua pita (*bands*) sedangkan jantan hanya tampak satu pita (*band*).

Primer sexing 2550f/2718R akan menghasilkan satu untai pita saat dielektroforesis baik pada burung jantan maupun betina (Fridolsson dan Ellegren, 1999). Hasil seperti ini diakibatkan dari salinan hasil amplifikasi kromosom W yang terlalu pendek, sehingga produk dari kromosom Z tidak terdeteksi.



Gambar 2. Hasil sexing dengan menggunakan primer 2550f/2718R

Keterangan: M=ledder 100bp, 1-13= nomor individu

Terbentuk pola pita tunggal yang menunjukkan jenis kelamin jantan pada sampel nomor 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, dan 13 yang berjumlah 11 sampel. Sedangkan pola pita ganda menunjukka jenis kelamin betina pada sampel nomor 1 dan 3 yang berjumlah 2 sampel. Ukuran pita DNA jantan berkisar antara 675 bp, sedangkan untuk ukuran pita DNA betina pada sampel 1 adalah 461,1 bp – 653,8 bp dan sampel 3 adalah 483,3 bp -661,5 bp.

## KESIMPULAN

1. Primer BF02 dapat mengamplifikasi dengan baik untuk sampel burung bondol kalimantan (*Lonchura fuscans*), sedangkan Primer BF03 harus dilakukan optimasi PCR dengan BSA 0,5 µl.
2. Primer 2550F/2718R dapat mengamplifikasi dua betina dan 11 jantan dari 13 sampel burung bondol kalimantan (*Lonchura fuscans*).
3. Terdapat 4 (empat) alel pada lokus BF02 dengan heterozigositas untuk Primer BF02 adalah 0,154 dengan frekuensi alel masing-masing adalah 0,3077, 0,5, 0,0769, dan 0,0384.



## SARAN

Metode ekstraksi yang digunakan dapat dilakukan dengan menggunakan *Kit-extraction*. Terdapat beberapa primer yang dapat mengamplifikasi genus *Lonchura* yang belum diuji oleh peneliti yaitu BF04, BF05, BF08, BF10, BF17, BF18, Indigo27, dan Indigo28. Elektroforesis yang dilakukan sebaiknya menggunakan metode PAGE, sehingga pita DNA dapat terpisah dengan baik.

Pembacaan hasil elektroforesis diperlukan penggunaan alat *genotyping* seperti *ABI 3500 Genetic Analyzer* untuk meningkatkan validitas data. Dilakukan optimasi PCR pada penggunaan primer BF03 untuk mengamplifikasi burung bondol kalimantan dengan BSA dan DMSO.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bello, N., Francino, O., Sa´nchez A. 2001. Isolation of Genomic DNA from Feathers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 13: 162-164.
- Bennet, P. 2000. *Microsatellites*. *J.Clin.Pathol. Mol.Pathol*, 53:177-183.
- Fatchiyah, Arumingtyas EL. 2006. *Kromosom, Gen, DNA, Sintesis Protein dan Regulasi*. Lab Biologi-Molekuler Brawijaya Malang. Malang.
- Fridolfsson, A.K, dan Ellegren, H. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *J. Avi. Bio*. 116-121.
- Griffiths, R., Mike C.D., Kate Orr, dan Robert JGD. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*. 7: 1071-1075.
- Indrawan, M., Primack, R. B., dan Supriatna, J. 2007. *Biologi Konservasi.: Yayasan Obor Indonesia*. Jakarta.
- Kahn N. W., John J. S., Quinn T. W. 1998. Chromosome-specific Intron size Differences in The Avian CHD Gene Provide an Efficient Method for Sex Identification in Birds. *Journal of the American Ornithologists Union* 15: 1074-1078.
- Krawczak M., dan Schmidtke J. 1994. *DNA Fingerprinting*. BIOS Scientific Publisher Limited. Oxford. UK.
- Macaulay M, L Ramsay, W Powell, R Waugh. 2001. A Representative, Highlyinformative, ‘Genotyping Set’ of Barley SSR. *Theor. Appl. Genet*. 102: 801 - 809.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.

- Nozawa, K., Shotake, T., Minezawa, M., Kawamoto, Y., Kawamot, K., Kawamoto, S. 1996. Population Genetic Study of The Javanese Macaque, *Macaca Fuscata*. In: Variations in The Asian Macaques. T. *Shotake and K. Wada* 9 (eds). Tokai University Press. Tokyo. Japan: 1 – 36.
- Reddy, A., Prakash, V., dan Shiveji, S. 2007. A Rapid, Non-Invasive, PCR-Based Method for Identification of Sex of The Endangered Old World Vultures Implications for Captive Breeding Programmes. *Current Science*. 92(5).
- Sudarsono. 2005. *Taksonomi Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Universitas Negeri Malang. Malang
- Sulandari, S. & Zein, M. S. A., 2003. *Panduan Praktis Laboratorium DNA*. Bidang Zoology. Pusat Penelitian Biologi-LIPI. Bogor. Halaman: 125.
- Tanabe, Y., Yokoyama, H., Murakami, J., Kano, H., Tanawaki, O., Okabayashi, H., Maeda, Y., Koshimoto, C., Nozawa, K., Tummennasen, K., Dashnyman, B., dan Zhanchiv, T. 1999. Polymorphism of the plumage colors, the skin variation and blood proteins the native chickens in Mongolia. *Report Of The Sociaty On Native Livestock*. 17:139 – 153.
- Wirastika, P. I. P. 2013. Penggunaan *Metode Molecular Sexing* untuk Penentuan Jenis Kelamin Burung Jalak Bali (*Leucopsar rothschildi*). Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Yogyakarta.
- Yodogawa, Y., Nishiumi., Saito, D., dan Okanoya, K. 2003. Characterization of eight polymorphic microsatellite loci from the Bengalese finch (*Lonchura striata* var. *domestica*). *Molecular Ecology Notes*. 3: 183–185.
- Yuda, P. 2008. *Conservation Genetic of the Java Sparrow (Padra oryzivora) and an Analysis of it's Viability*. Thesis. School of Marine and Tropical Biology. James Cook University. Australia.